

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도로 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 특이적 sgRNA를 이용하여 CRISPR 시스템 기능을 향상시키는 방법, 상기 특이적 sgRNA 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 CRISPR 시스템, 상기 특이적 sgRNA 및 그의 이용에 관한 것이다. 본 발명에 따른 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 이를 이용한 CRISPR 시스템은 기존 sgRNA에 비하여 표적 DNA에 유의적으로 특이성 및 억제 효과를 향상시키는 바, 이러한 sgRNA와 이를 이용한 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

명세서

발명의 명칭: CRISPR 시스템 기능 향상 방법 및 그의 이용 기술분야

- [1] 본 발명은 특이적 sgRNA를 이용하여 CRISPR 시스템 기능을 향상시키는 방법, 상기 특이적 sgRNA 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 CRISPR 시스템, 상기 특이적 sgRNA 및 그의 이용에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 1970년대 DNA의 특정 서열을 인지해 자르는 제한효소가 발견된 것을 시작으로 유전자 조작기술은 시대에 시대를 거듭하여 급격하게 발전해 왔다. 하지만 제한효소를 활용한 유전자 조작기술은 그 한계가 명확했다. 구체적으로, 제한효소는 인식할 수 있는 유전자 서열의 길이가 6~8개 정도로 매우 짧아, 약 46(4,096)개의 순서쌍 밖에 구분하지 못하는 문제가 존재했다. 반면에 CRISPR/CAS9 시스템은 이러한 한계가 없어 이론적으로 인간 이상의 고등 생명체에도 적용 가능하다.
- [4] CRISPR/CAS9 시스템은 크리스퍼(Clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR) 유전자 가위라 불리는 게놈 편집 방법으로, 특정 염기서열에 특이적으로 결합하는 RNA(gRNA)와 특정한 염기서열을 자르는 가위 역할인 Cas9 뉴클레아제 (nuclease)로 구성된다. 이러한 CRISPR/CAS9 시스템을 이용하면 세포나 동물에 플라스미드(Plasmid) DNA를 도입하여 특정 유전자의 기능을 억제할 수 있는 녹-아웃(knock-out)이 가능하다.
- [5] CRISPR/CAS9 시스템은 불과 몇 년 전에 과학자들에 의해 발견된 것으로, 박테리아 등 단세포 유기체가 박테리오파지로부터 스스로를 지키는 아주 오래된 방법이다. 유기체가 박테리오파지의 DNA를 잘라 자신의 유전자에 붙여 기억하여 적응면역을 통해 살아남는 것으로 수백만 년에 걸쳐 진화되었고, 이것이 연구실에서 유기체의 DNA를 빠르게 편집할 수 있는 간단하고 명쾌한 방법으로 연구되었다.
- [6] 구체적으로, 본래의 CRISPR/CAS9 시스템은 박테리아가 이전에 침입했던 바이러스의 DNA 일부를 자신의 유전체에 저장해둔 후, 바이러스가 침입할 때에 그 정보를 다시 꺼내어 바이러스 DNA만을 찾아 절단하는 데 쓰는 박테리아의 자기보호 메커니즘이다. 이를 유전체공학에 이용함으로써, 특정 유전자의 염기서열을 찾아가는 시발체(Primer)를 제작해 절단 효소인 Cas9 효소와 짝을 이루어 표적이 되는 DNA 염기서열에 달라붙어 DNA 절단이 일어난다. 따라서 DNA 복원(수선) 과정에서 돌연변이가 발생하게 된다.
- [7] 따라서 CRISPR/CAS9 시스템이 발견되기 전까지 DNA 편집은 정교한 연구실,

다년간의 경험, 막대한 금액이 있어야 가능하여 실질적으로 적용할 수 있는 범위가 매우 작은 문제가 있었으나, CRISPR/CAS9 시스템에 의해 이러한 문제가 획기적으로 해결되었다.

- [8] 이에 따라 CRISPR/CAS9 시스템은 줄기세포 및 체세포에서 유전병의 원인이 되는 돌연변이를 교정하거나 항암 세포치료제를 개발하는 도구가 될 것으로 큰 기대를 모으고 있다.
- [9] 그러나 아직까지는 CRISPR/CAS9 시스템을 실제로 치료제 등에 적용하는데 여러 가지 문제들이 존재한다. 예컨대 CRISPR/CAS9 시스템을 인체에 실질적으로 활용하기 위해서는 안전성이 매우 중요하며, 구체적으로 표적 유전자가 확실히 제거되어야 하고, 표적 유전자 외의 유전자는 영향을 받지 않아야 한다. 이는 CRISPR/CAS9 시스템이 표적 유전자의 염기서열과 유사한 비표적 염기서열에도 변이를 일으킬 가능성이 있기 때문이며, 이러한 가능성에 의해 예상치 못한 돌연변이 또는 예상 불가능한 치명적인 문제가 발생할 수 있는 위험 또는 잠재적 위험이 제거되어야 함을 의미한다.
- [10] 특히 표적 유전자에만 특이적이면서 정교하게 유전자를 편집하기 위한 CRISPR/CAS9 시스템을 이용한 기술은 복잡하고 어려운 상황에 있다. 따라서 종양을 포함한 인체 질병의 원인 기전을 밝히는 연구, 나아가 인체 전반적으로 CRISPR/CAS9 시스템을 이용하기 위해서는 표적 유전자에만 특이적이면서 정교하게 적용되어야 한다.
- [11] 그러므로 CRISPR/CAS9 시스템을 이용하여 표적 유전자를 높은 정확도 및 효율, 특이도와 민감도로 표적하는 시스템의 개발이 절실히 필요하다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 이에 본 발명자들은 특정 DNA를 타겟하여 인식하는 가이드 RNA의 변형을 통하여 CRISPR 시스템 기능을 향상시키는 방법을 개발하는데 예의 노력하였다. 본 발명자는 가이드 RNA에 표적 DNA와의 1개 이상의 미스매치 (mismatch)가 오히려 CRISPR 시스템의 정확도, 특이도 및 효율을 향상시키는 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [14] 따라서 본 발명의 목적은 CRISPR 시스템 기능을 향상시키는 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 또한, 본 발명의 다른 목적은 기능이 향상된 DNA 표적용 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 또한, 본 발명의 목적은 상기 특성을 갖는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA), 단일 가닥 가이드 RNA의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [17] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 시스템을 이용한 유전자 교정용 조성물, 암의 예방 또는 치료용 조성물 및 진단용 또는 이미징 조성물에 관한 것이다.

[18] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 DNA 표적용 조성물을 이용한 DNA 표적 방법, 상기 유전자 교정용 조성물을 이용한 유전자 교정 방법, 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이용한 암의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[19]

과제 해결 수단

[20] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[21] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA에서, 표적 DNA와 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열 간에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, CRISPR 시스템의 기능을 향상시키는 방법을 제공한다.

[22] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스어-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일 수 있다.

[23] 또한 상기 방법은 미스매치가 없는 가이드 RNA에 비하여 특이성 또는 민감성이 증가하는 것일 수 있다.

[24] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및

[25] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물에 있어서,

[26] 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 것인, 조성물을 제공한다.

[27] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스어-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일 수 있다.

[28] 상기 Cas9은 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)일 수 있다. 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB, KOX, SID, MBD2, MBD3, DNMT1, DNMT3A 및 DNMT3B로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 도메인이 연결된 것일 수 있으며, 상기 Cas9 단백질은 바람직하게는 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것일 수 있다.

[29] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열이 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)를 제공한다. 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스어-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일 수 있다.

[30] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)의 제조 방법을 제공한다.

- [31] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및
- [32] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 유전자 교정용 조성물을 제공한다.
- [33] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및
- [34] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [35] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및
- [36] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 진단용 또는 이미징 조성물을 제공한다.
- [37] 또한, 본 발명은 상기 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법을 제공한다.
- [38] 또한, 본 발명은 상기 유전자 교정용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 교정 방법을 제공한다.
- [39] 또한, 본 발명은 상기 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[40]

발명의 효과

- [41] 본 발명에 따른 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 이를 이용한 CRISPR 시스템은 기존 sgRNA에 비하여 표적 DNA에 유의적으로 특이성 및 억제 효과를 향상시키는 바, 이러한 sgRNA와 이를 이용한 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[42]

도면의 간단한 설명

- [43] 도 1은 -124 C>T mutant TERT (Telomerase reverse transcriptase) promoter를 표적하는 프로토스페이스 (protospacer) 서열을 나타낸 도이다.
- [44] 도 2는 Mutant TERT promoter DNA 특이적 sgRNA 선별을 위한 *in vitro* DNA cleavage assay를 수행한 결과이다.
- [45] 도 3은 CRISPR interference (CRISPRi) system의 개요를 도식화한 도이다.
- [46] 도 4는 dCas9과 후성편집자 (epigenetic editor)들의 가능한 조합을 도식화한

도이다.

- [47] 도 5는 세포실험을 통한 CRISPRi system 작동 여부를 Huh-7.5 간세포주에서 reporter assay로 확인한 도이다. (A) 2-1 sgRNA, (B) 2-2 sgRNA.
- [48] 도 6에서 (A)는 2-1, 2-2 sgRNA의 P19 부위를 표시한 도이다. (B)는 2-1, 2-2 P19 mutant sgRNA를 이용한 *in vitro* DNA cleavage assay 결과를 나타낸 도이다. P19G: 2-1, 2-2 원본 sgRNA; P19C, P19A, P19U: 점 돌연변이 (point mutation) sgRNA.
- [49] 도 7은 간암세포주 (A) Hep3B (wild TERT promoter), (B) Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter)에서 CRISPRi system 작동 여부를 확인한 결과이다. TERT protein 발현량을 웨스턴 블롯 (western blot)으로 확인하였다. P19G; 2-1, 2-2 원본 sgRNA; P19C, P19A, P19U: 점 돌연변이 (point mutation) sgRNA.
- [50] 도 8은 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스의 게놈 구조 모식도이다.
- [51] 도 9는 간암간암세포주인 Hep3B (wild TERT promoter), Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter)에서 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스에 의한 TERT 유전자 발현 감소를 RNA 수준에서 확인한 도이다. sg2-1: 2-1 원본 sgRNA; sg2-1 p19: P19C mutant sgRNA.
- [52] 도 10은 Mutant sgRNA를 이용한 DNA cleavage assay 결과를 나타낸 도이다. (A) 2-1 sgRNA mutant, (B) 2-2 sgRNA mutant.
- [53] 도 11은 Mutant sgRNA와 dCas9을 이용한 gel shift assay 결과를 나타낸 도이다. (A)(B) 2-1 sgRNA mutant, (C)(D) 2-2 sgRNA mutant.
- [54] 도 12는 KRAS의 G12번째 아미노산을 코딩하는 염기서열이 GGT에서 GTT인 G12V로 돌연변이된 mutant KRAS promoter를 표적하는 프로토스페이스 (protospacer) 서열을 나타낸 도이다.
- [55] 도 13은 G12V KRAS mutant sgRNA를 이용한 DNA cleavage assay 결과를 나타낸 도이다.
- [56] 도 14는 G12V KRAS mutant sgRNA와 dCas9을 이용한 gel shift assay 결과를 나타낸 도이다.

[57]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [58] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [59] 본 발명은
- [60] CRISPR 시스템의 기능을 향상시키는 방법으로서,
- [61] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA에서, 표적 DNA와 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열 간에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 방법을 제공한다.
- [62]
- [63] 본원에서 사용된, 용어 "가이드 RNA" 는 표적 DNA에 특이적인 RNA로, Cas 단백질과 복합체를 형성할 수 있고, Cas 단백질을 표적 DNA에 가져오는 RNA를

말한다.

- [64] 본 발명에서, 상기 가이드 RNA는 두 개의 RNA, 즉, CRISPR RNA (crRNA) 및 트랜스활성화 crRNA (transactivating crRNA, tracrRNA)로 이루어져 있는 것일 수 있으며, 또는 crRNA 및 tracrRNA의 필수적 부분의 융합에 의해 생성된 단일 사슬 RNA (single-chain RNA, sgRNA)일 수 있다.
- [65] 상기 가이드 RNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 이중RNA (dual RNA)일 수 있다.
- [66] 만약 상기 가이드 RNA가 crRNA 및 tracrRNA의 필수적인 부분 및 표적과 상보적인 부분을 포함한다면, 어떠한 가이드 RNA라도 본 발명에 사용될 수 있다.
- [67] 상기 crRNA는 표적 DNA와 혼성화될 수 있다.
- [68] 가이드 RNA는 RNA의 형태 또는 가이드 RNA를 암호화하는 DNA의 형태로 세포 또는 유기체에 전달될 수 있다. 가이드 RNA는 분리된 RNA의 형태, 바이러스 벡터에 포함되어 있는 RNA, 또는 벡터에 암호화되어 있는 형태일 수도 있다. 바람직하게, 상기 벡터는 바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 또는 아그로박테리움 (agrobacterium) 벡터일 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [69] 본 발명에서 사용하는 용어 미스매치 (mismatch)는 DNA간 또는 DNA와 RNA 염기 간에 상보적인 결합에서 비상보적인 서열이 존재하는, 부적정 염기쌍이 발생하는 것을 의미한다. 본 발명자는 CRISPR/Cas에 이용되는 가이드 RNA와 표적 DNA간에 의도적인 미스매치를 부여하여 CRISPR가 더욱 특이적으로 표적 DNA를 인지하고, 이를 억제하거나, 수선하거나, 파괴할 수 있음을 확인하였다.
- [70] 이에 따라, 본 발명에서 제공하는 방법은 미스매치가 없는 가이드 RNA에 비하여 특이성 또는 민감성이 증가하는 것일 수 있다.
- [71] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스-인접 모티프(proto-spacer-adjacent motif, PAM)으로부터 +1 내지 +19에 위치할 수 있다.
- [72] 한편, 상기 미스매치가 위치할 수 있는 표적 DNA 상의 부위는 프로토스페이스-인접 모티프(proto-spacer-adjacent motif, PAM)로부터 +2 내지 +8에 해당하는 시드 (seed) 부위를 포함한다. 상기 시드 (seed) 부위 또는 시드 (seed) 서열은 sgRNA 가이드 서열의 염기들 중 활성화에 매우 중요하다고 알려진 부위를 의미하며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 시드 (seed) 부위에 위치하는 미스매치 도입으로도 sgRNA 활성화 또는 특이성의 변화를 확인하여, 상기 미스매치가 위치할 수 있는 표적 DNA 상의 부위는 시드 (seed) 부위 내부 및 외부 모두가 될 수 있음을 확인하였다.
- [73] 상기 미스매치를 포함시킨 sgRNA와 이를 이용한 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있다.
- [74] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는

- 가이드 RNA; 및
- [75] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물에 있어서,
- [76] 상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 것인, 조성물을 제공한다.
- [77] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스어-인접 모티프(proto-spacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일 수 있다.
- [78] 본원에서 사용된, 용어 "Cas 단백질"은 CRISPR/Cas 시스템에서 필수적인 단백질 요소를 의미하고, CRISPR RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 crRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA)로 불리는 두 RNA와 복합체를 형성할 때, 활성 엔도뉴클레아제 또는 니카아제 (nickase)를 형성한다.
- [79] Cas 유전자 및 단백질의 정보는 국립생명공학정보센터 (national center for biotechnology information, NCBI)의 GenBank에서 구할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [80] Cas 단백질을 암호화하는 CRISPR-연관 (CRISPR-associated, cas) 유전자는 종종 CRISPR-반복 스페이스어 배열 (CRISPR repeat-spacer array)과 관련된다. 40개 이상의 서로 다른 Cas 단백질 패밀리가 기재되어 왔다. 이러한 단백질 패밀리 중, Cas1은 서로 다른 CRISPR/Cas 시스템 중에서 아주 흔한 (ubiquitous) 것으로 보인다. CRISPR-Cas 시스템은 세 종류가 있다. 이들 중에서, Cas9 단백질 및 crRNA 및 tracrRNA를 수반하는 타입 II CRISPR/Cas 시스템이 대표적이며, 잘 알려져 있다. cas 유전자 및 반복 구조 (repeat structure)의 특정 조합은 8개의 CRISPR 하위 유형 (Ecoli, Ypest, Nmeni, Dvulg, Tneap, Hmari, Apern, 및 Mtube)을 정의하는데 사용되어 왔다.
- [81] 본 발명의 조성물은 단백질의 형태 또는 Cas 단백질을 암호화하는 핵산의 형태로 Cas 요소를 포함할 수 있다.
- [82] 바람직하게, Cas 단백질은 Cas9 단백질 또는 이의 변이체이다.
- [83] 상기 Cas9 단백질은 바람직하게는 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)일 수 있다.
- [84] 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB (Kruppel associated box), KOX (Kruppel-type zinc finger factor), SID (mSin interaction domain), MBD2(methyl-CpG binding domain protein 2), MBD3, DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) 및 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 도메인이 연결된 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 상기 Cas9 단백질은 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것일 수 있다.
- [85] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스어-인접 모티프(proto-spacer-adjacent motif, PAM)으로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일

수 있다.

- [86] 상기 미스매치가 위치할 수 있는 표적 DNA 상의 부위는 프로토스페이서-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +2 내지 +8에 해당하는 시드(seed) 부위를 포함한다.
- [87] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열이 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)를 제공한다.
- [88] 상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이서-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것일 수 있다.
- [89] 상기 미스매치가 위치할 수 있는 표적 DNA 상의 부위는 프로토스페이서-인접 모티프(protospacer-adjacent motif, PAM)로부터 +2 내지 +8에 해당하는 시드(seed) 부위를 포함한다.
- [90] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및
- [91] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [92] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [93] 본 발명에서 암은 고형암 또는 비고형암일 수 있다. 고형암은 예를 들어 간, 폐, 유방, 피부 등 장기에 암 종양이 발생한 것을 말한다. 비고형암은 혈액 내에서 발생한 암이고, 혈액암으로도 불린다. 상기 암은 암종 (carcinoma), 육종(sarcoma), 조혈세포 유래의 암, 배세포 종양(germ cell tumor), 또는 모세포종(blastoma)일 수 있다. 암종은 상피세포(epithelial cells) 유래의 암일 수 있다. 육종은 각 조직이 골수 밖의 중간엽 세포(mesenchymal cell)에서 유래된 세포로부터 발생된 것일 수 있는 결합 조직(즉, 뼈, 연골, 지방, 및 신경)으로부터 유래된 암일 수 있다. 조혈세포 유래의 암은 골수를 떠나 림프절 및 혈액에서 성숙하는 경향이 있는 조혈 세포로부터 유래할 수 있다. 배세포 종양은 다능성 세포(pluripotent cell)로부터 유래된 암일 수 있다. 상기 다능성 세포는 정소 또는 난소에 종종 존재할 수 있다. 모세포종은 미성숙 전구 세포 또는 배아 조직으로부터 유래할 수 있다. 상기 암은 췌장암, 담도암, 신경내분비종양, 폐암, 유방암, 난소암, 간암, 기관지암, 비인두암, 후두암, 위암, 방광암, 대장암, 결장암, 자궁경부암, 뇌암, 전립선암, 골암, 두경부암, 피부암, 갑상선암, 부갑상선암 및 요관암, 식도암, 위암, 대장암, 간암, 췌장암, 담도암, 신장암, 방광암, 전립선암, 고환암, 생식세포종, 갑상선암, 난소암, 자궁 경부암, 자궁 내막암, 림프종, 골수형성이상 증후군(myelodysplastic syndromes: MDS), 골수섬유증(myelofibrosis), 급성 백혈병, 만성 백혈병, 다발성 골수종, 육종 및 피부암으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있다.

- [94] 바람직하게는, 상기 암은 간암일 수 있다.
- [95] 본 발명에서 사용되는 용어인 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암을 억제하거나 암의 발병을 지연시키는 모든 행위를 말한다. 상기 용어 "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여에 의해 암의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [96]
- [97] 본 발명에서, 상기 약학 조성물은 암의 예방 또는 치료방법에 이용될 수 있으며, 구체적으로 상기 예방 또는 치료방법은 암이 발병되거나 또는 발병될 것으로 예상되는 개체에 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [98] 본 발명의 용어 "투여"란, 적절한 방법으로 개체에게 상기 조성물을 도입하는 것을 의미한다.
- [99] 본 발명의 용어 "개체"란, 암이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축 등의 모든 동물을 의미하고, 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [100] 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명의 용어, "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 예를 들면, 상기 조성물은 유효성분으로 1일 0.01 내지 500 mg/kg으로, 구체적으로 10 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으며, 상기 투여는 하루에 한 번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다. 또한, 본 발명의 약학 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 조성물을 0.001 내지 50% 중량 백분율로 포함할 수 있다.
- [101] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [102] 본 발명의 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [103] 본 발명의 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는

멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 구체적으로, 제형화할 경우 통상 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제 등도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위캡슐, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

- [104] 본 발명의 상기 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [105] 본 발명의 상기 조성물은 기타 항암제, 방사선 치료, 외과적 수술과 병행될 수 있으며, 당업자에 의해 적절하게 선택 및 병행될 수 있다.
- [106] 또한, 본 발명은 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및
- [107] Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 진단용 또는 이미징 조성물을 제공한다.
- [108] 본 발명에서 사용된 용어 "진단"은 병태 생리의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 암의 발병 여부, 경과 또는 예후를 확인하는 것이다.
- [109] 상기 DNA 표적용 조성물은 영상을 통하여 암을 진단하기 위하여 분자 영상용 형광체와 결합할 수 있다.
- [110] 상기 분자 영상용 형광체는 형광을 발생시키는 모든 물질을 말하며, 적색이나 근적외선 (near-infrared)의 형광을 발광하는 것이 바람직하며, 양자 수득량 (quantaum yield)이 높은 형광체가 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [111] 상기 분자 영상용 형광체는 상기 DNA 표적용 조성물과 결합할 수 있는 형광체, 형광 단백질 또는 기타 영상용 물질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [112] 형광체는 플루오레신 (fluorescein), 보디피 (BODYPY), 테트라메틸로드아민 (Ttrramethylrhodamine), 알렉사 (Alexa), 시아닌 (Cyanine), 알로피코시아닌 (allopicocyanine) 또는 이들의 유도체가 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [113] 형광 단백질은 Dronpa 단백질, 형광 발색 유전자 (EGFP), 적색 형광 단백질 (red fluorescent protein, DsRFP), 근적외선 형광을 나타내는 시아닌 형광체인 Cy5.5 또는 기타 형광 단백질이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [114] 기타 영상용 물질은 산화철, 방사성 동위원소 등이 바람직하나 이에 한정되지 않으며, MR, PET과 같은 영상 장비에 응용될 수 있다.
- [115] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법을 제공한다.
- [116] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 유전자 교정용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 교정 방법을 제공한다.
- [117] 또한, 본 발명은 본 발명에 따른 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[118]

발명의 실시를 위한 형태

- [119] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[120]

- [121] **실험예 1: TERT wild / -124 mutant (C>T) promoter를 가지는 reporter plasmid 제작**

- [122] Wild / -124 mutant (C>T) TERT 프로모터를 얻기 위해 Hep3B (wild TERT promoter), Huh-7.5 (-124 (C>T) mutant TERT promoter) 세포에서 genomic DNA를 추출하였다. 1×10^6 개 세포에 Quick Extract DNA Extraction solution (Epicentre) $200\mu\text{l}$ 를 넣은 후 65°C 에서 6분간 반응한 뒤 15초 동안 볼텍싱 (vortexing) 하였다. 98°C 에서 2분간 반응시키고 genomic DNA를 추출하여 TERT promoter PCR의 주형으로 사용하였다. $2\mu\text{l}$ genomic DNA, 5X buffer, 200uM dNTP, 0.2uM forward primer, 0.2uM reverse primer, 0.4U phusion DNA polymerase (NEB)를 혼합한 뒤 95°C 30초, 58°C 30초, 72°C 30초의 조건으로 30 cycle을 반복하여 290bp 길이를 가지는 wild / mutant TERT promoter DNA를 얻어내었다. 얻어진 TERT promoter DNA는 pGL3-flrefly luciferase(F.luci) plasmid에 in-fusion HD cloning kit을 이용하여 클로닝 (cloning) 하였다.

[123]

- [124] **실험예 2: In vitro DNA cleavage assay**

- [125] *E.coli*에서 정제한 Cas9 단백질과 *in vitro* 전사 (transcription)로 제작한 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA로 TERT 프로모터 DNA 절단을 아가로스 겔에서 확인하였다. Substrate DNA로는 pGL3-wild/mutant TERT promoter-F.luci vector를 ScaI 제한효소 (restriction enzyme)로 선형화 (linearization) 시킨 DNA를 사용하였다. Substrate DNA 100ng, Cas9 reaction buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.5,

150mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT), 0.5 pmole Cas9 protein, 1 pmole sgRNA를 10 μ l volume으로 혼합한 뒤 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 250mM EDTA를 포함한 3X DNA dye를 반응액에 넣어 반응을 멈춘 뒤 1% TBE 젤 (gel)에 반응액을 로딩하여 절단된 DNA를 EtBr 염색으로 확인하였다.

[126]

[127] **실험 예 3: Luciferase assay**

[128] 12-웰 플레이트에 1 x 10⁵개의 Huh-7.5 세포를 배양한 뒤 50ng pTK-renilla luciferase plasmid, 500ng wild or mutant TERT promoter-firefly luciferase plasmid, 1 μ g sgRNA 발현 plasmid, 500ng dCas9 발현 plasmid를 opti-MEM 배지와 50ul volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 동시에 2ug의 polyethylenimine (PEI)를 opti-MEM 배지와 100ul volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 각각의 plasmid DNA 용액과 PEI 용액을 혼합한 뒤 상온에서 20분간 반응시켰다. 20분 뒤 반응액을 각각의 세포에 넣어 준 뒤 CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양하였다. 6시간 뒤 plasmid DNA와 PEI가 들어 있는 배양액을 제거한 뒤 새 배양액으로 교체해준 다음 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 뒤 배양액을 제거하고 1X PBS 용액으로 씻어준 뒤 passive lysis buffer (Promega) 100 μ l를 넣어 준 뒤 상온에서 15분간 반응시켰다. 세포 용해물 (Cell lysate)을 마이크로튜브 (micro-tube)로 옮긴 뒤 13000rpm으로 1분간 원심분리하였다. 상기 용해물 10ul를 dual-luciferase assay kit (Promega)을 사용해 luminometer (Berthold)에서 luciferase 값을 측정하였다.

[129]

[130] **실험 예 4: Western blot**

[131] 6-웰 플레이트에 3 x 10⁵개의 Huh-7.5와 Hep3B 세포를 배양한 뒤 sgRNA와 KRAB-dCas9을 발현하는 plasmid DNA를 PEI를 이용해 형질감염시켰다. 2 μ g의 pTZ-U6+1-sgRNA plasmid DNA와 1 μ g의 3xFlag-KRAB-dCas9 plasmid DNA를 opti-MEM 배지와 100 μ l volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 동시에 2ug의 PEI를 opti-MEM 배지와 100 μ l volume이 되도록 섞은 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 각각의 plasmid DNA 용액과 PEI 용액을 혼합한 뒤 상온에서 20분간 반응시켰다. 20분 뒤 반응액을 각각의 세포에 넣어 준 뒤 CO₂ incubator에서 6시간 동안 배양하였다. 6시간 뒤 plasmid DNA와 PEI가 들어 있는 배양액을 제거한 뒤 새 배양액으로 교체해준 다음 48시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다. 48시간 뒤 배양액을 제거하고 1X PBS 용액으로 씻어준 뒤, 150 μ l RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS)를 넣고 4°C에서 20분간 반응시켰다. 용해된 세포를 1.5ml 마이크로튜브로 옮긴 후 4°C에서 30분 동안 rotation 시킨 후 15000rpm에서 15분간 원심분리 후 상층액만 따서 새로운 마이크로튜브에 옮겼다. Smart™ BCA protein assay kit을 이용해 total protein 정량값을 얻은 뒤 30 μ g의 총 단백질을 10% SDS-PAGE에 로딩하였다. 이후 PVDF 막 (membrane)으로 트랜스퍼 (transfer)한

뒤 상온에서 1시간동안 블로킹 (blocking) 용액으로 블로킹하였다. 1차 항체가 들어 있는 블로킹 용액으로 교체한 뒤 4°C에서 16시간 동안 반응시키고, 0.1% Tween-20, 1X PBS 용액으로 5분씩 6회 세척하였다. 그 후, 2차 항체가 들어 있는 블로킹 용액으로 교체하여 상온에서 1시간 동안 반응시키고, 0.1% Tween-20, 1X PBS 용액으로 5분씩 6회 세척한 뒤 막을 ECL 용액에서 1분간 반응시키고 x-ray 필름에 감광시킨 후 현상액 (developer)에 담그어 단백질 밴드를 확인하였다. 사용한 항체는 다음과 같다. 1차 항체: Anti-3xFlag antibody (Sigma), anti-human telomerase reverse transcriptase (TERT) (Fitzgerald), anti-tubulin (MBL), 2차 항체: Goat anti-mouse-HRP conjugated (Santa cruz), Anti-rabbit-HRP conjugated.

[132]

[133] 실험예 5: Gel shift assay

[134] *E.coli*에서 정제한 뉴클레아제 (nuclease) 활성이 없는 dead Cas9 (dCas9, D10A/H840A 돌연변이)과 sgRNA의 표적 부위를 포함하고, 이중나선의 양쪽 5' 말단이 비오틴 (biotin)으로 표지된 이중나선 절편 DNA와 점 돌연변이 (point mutation)를 포함하는 sgRNA들을 *in vitro*에서 결합시켰다. 5ng의 비오틴으로 표지된 이중나선 표적 DNA, 5pmole sgRNA, 0.5pmole dCas9을 Cas9 reaction buffer (20mM Tris-HCl, pH 7.5, 150mM KCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT)에서 10 μ l volume으로 혼합한 뒤 37°C에서 30분간 반응시켰다. 6X DNA loading dye를 반응액에 넣어준 뒤 6% native polyacrylamide gel (6% poly-acrylamide, 2% glycerol, 10mM MgCl₂)에 반응액을 로딩하여 4°C에서 120V로 1시간 30분간 전기영동 하였다. DNA-dCas9-sgRNA 복합체 (complex)를 나일론 (nylon) 막으로 트랜스퍼한 뒤 UV-cross linking으로 고정시켰다. Streptavidin-HRP를 넣어주어 반응시킨 뒤 ECL 용액에서 반응시키고 X-ray 필름에 감광시킨 후 분리된 DNA 밴드를 확인하여 복합체 형성 여부를 확인하였다.

[135]

[136] 실시예 1: -124 C>T mutant TERT promoter DNA에 특이적으로 작용할 수 있는 sgRNA 제작

[137] TERT promoter의 -124번째가 C>T 돌연변이 된 mutant TERT promoter만 표적할 수 있는 sgRNA를 제작하기 위해 염기서열 분석을 통해 CRISPR/Cas9 system이 적용될 수 있는 -124번째 돌연변이를 포함하는 9개의 프로토스페이스 (protospacer) 서열을 선정하였다 (도 1).

[138] 선정된 프로토스페이스 서열을 가이드 서열 (guide sequence)로 가지는 9종의 sgRNA는 -124 C>T mutant TERT promoter와는 100% 일치하지만 wild TERT promoter와는 1개의 미스매치 (mismatch)를 가지는 특징을 가지고 있다. 이러한 특징을 가지는 9종의 mutant TERT promoter 표적 sgRNA를 제작하였다.

[139] -124 C>T 돌연변이를 가지는 mutant TERT promoter 특이적으로 작용하는지 확인하기 위해 *in vitro* DNA cleavage assay를 수행하였다. 9종의 sgRNA중에 2-1, 2-2번 sgRNA가 wild TERT promoter에 작용하지 않고 -124 C>T mutant TERT

promoter 특이적 DNA cleavage를 유발하는 것을 확인하였다 (도 2). 이를 통해 2-1, 2-2번 프로토스페이서를 가이드 서열로 가지는 sgRNA들이 -124 C>T mutant TERT promoter에 특이적으로 작용함을 확인하였다. 2-1과 2-2번 sgRNA 가이드 서열은 다음과 같다.

[140] 2-1 : 5' - GGGGCUGGGAGGGCCCCGGAA - 3' (서열번호 1)

[141] 2-2 : 5' - GGGCUGGGAGGGCCCCGGAAG - 3' (서열번호 2)

[142]

[143] **실시예 2: CRISPRi system 제작 및 최적의 조합 확인**

[144] -124 C>T mutant TERT promoter를 표적하여 TERT 유전자의 발현을 억제하기 위해 D10A / H840H 돌연변이를 가지는 뉴클레아제 활성이 없는 dead Cas9 (dCas9) 과 후성편집자 (epigenetic editor)를 도입한 CRISPR interference (CRISPRi) system을 제작하였다 (도 3). 또한, dCas9을 기준으로 N-말단 / C-말단에 후성편집자인 KRAB과 DNA methyltransferase 3A (DNMT3A)를 도입한 다양한 조합의 CRISPRi system을 제작하였다 (도 4). 그 다음, dCas9-후성편집자 단백질과 sgRNA로 구성된 CRISPRi system이 작동하는지 reporter assay를 통해 세포실험에서 확인하였다 (도 5).

[145] 도 5의 A 및 B에 각각 나타낸 바와 같이, mutant TERT promoter 특이적 sgRNA인 2-1, 2-2 sgRNA에 의해 mutant TERT promoter-luciferase reporter값이 wild TERT promoter-luciferase reporter에 비해 현저히 낮아, 2-1, 2-2 sgRNA가 luciferase 발현을 효율적으로 감소시킴을 확인하였다. 다양한 dCas9-후성편집자 조합들 중에서는 KRAB-dCas9의 조합이 다른 dCas9-후성편집자 조합들보다 mutant TERT promoter 특이적으로 그 발현을 저해하는 것으로 확인되어 KRAB-dCas9의 조합이 CRISPRi system에 최적임을 확인하였다.

[146]

[147] **실시예 3: 2-1, 2-2 sgRNA의 guide sequence 최적화**

[148] Reporter assay 세포실험에서 CRISPRi system이 wild TERT promoter에 어느 정도 작용하는 것이 확인되어, wild TERT promoter에는 작용하지 않고 mutant TERT promoter에 더욱 특이적으로 작용하는 CRISPRi system을 위해 TERT promoter에 결합하는 sgRNA의 가이드 서열에 점 돌연변이 (point mutation)를 도입하여 wild TERT promoter 서열에 2개의 미스매치가 형성되도록 가이드 서열의 P19 부위의 염기(PAM distal 부위) (도 6A)에 기존의 G에서 C, A, U로의 돌연변이를 도입한 sgRNA를 제작하였다.

[149] 또한, 제작한 sgRNA들을 이용해 *in vitro* DNA cleavage를 통해 돌연변이 sgRNA들의 활성이 변하는지 확인하였다 (도 6B).

[150] 도 6B에 나타낸 바와 같이, 원본 2-1, 2-2 sgRNA보다 P19부위에 돌연변이를 도입한 mutant sgRNA들의 mutant TERT promoter에 대한 활성이 증가함을 확인하였다.

[151] 이는 PAM 서열에서 먼 쪽의 가이드 서열들에 돌연변이를 도입하여도

sgRNA의 활성화에는 영향을 끼치지 않는다는 기존의 보고들과는 전혀 다른 결과에 해당한다.

[152]

[153] 실시예 4: CRISPRi system에 의한 endogenous TERT 유전자 발현 억제 확인

[154] 위에서 제작한 CRISPRi system이 염색체상의 TERT promoter에 작용하여 내재적 (endogenous) TERT 유전자의 발현을 억제하는지 확인하기 위하여 TERT protein 발현량 변화를 측정하였다. 구체적으로, wild TERT promoter를 가지는 Hep3B 간암 세포주와 -124 C>T mutant TERT promoter를 가지는 Huh-7.5 간암 세포주를 이용해 실험을 수행하였다.

[155] KRAB-dCas9 발현 플라스미드 (plasmid)와 sgRNA를 발현하는 플라스미드를 각각의 세포에 공동 형질감염 (co-transfection) 시킨 뒤 TERT protein 발현량 변화를 확인하였다 (도 7).

[156] 도 7B에 나타낸 바와 같이, 2-1 sgRNA의 경우 -124 C>T mutant TERT promoter를 가지는 Huh-7.5 간암세포주에서 P19U 돌연변이를 도입한 sgRNA가 TERT protein의 발현을 감소시키는 것을 확인하였다. 2-2 sgRNA의 경우 원본 2-2 sgRNA (P19G) 보다 P19C, P19A 돌연변이를 도입한 sgRNA가 TERT protein의 발현을 더욱 감소시킴을 확인하였다.

[157] 반면, 도 7A에 나타낸 바와 같이, 2-1, 2-2 sgRNA 모두 wild TERT promoter를 가지는 Hep3B 간암세포주에서는 CRISPRi system에 의해 TERT protein 발현에 전혀 영향이 없음을 확인하였다. 이를 통해 TERT promoter를 표적하는 CRISPRi system이 mutant TERT promoter에 특이적으로 작용해 내재적 TERT protein 발현을 억제함을 확인하였다.

[158]

[159] 실시예 5: CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스의 제작

[160] CRISPRi system 전달 효율을 높이기 위해 CRISPRi system을 발현하는 아데노바이러스를 제작하였다 (도 8). 2-1 sgRNA와 2-1 P19C mutant sgRNA를 발현하는 아데노바이러스로 Hep3B (wild TERT promoter)와 Huh-7.5 (-124 C>T mutant TERT promoter) 간암세포주를 감염시키고 TERT mRNA의 발현량을 관찰하였다 (도 9).

[161] 도 9에 나타낸 바와 같이, Huh-7.5 간암 세포주에서 원본 2-1 sgRNA보다 2-1 P19C mutant sgRNA에 의해 TERT mRNA의 발현이 더 감소함을 확인하였다. 구체적으로, -124 C>T mutant TERT promoter를 보유한 Huh-7.5 세포주에서는 sgRNA를 발현하지 않고, KRAB-dCas9만 발현하는 아데노바이러스에 비해 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA들을 발현하는 아데노바이러스들에 의해 TERT 유전자의 발현이 90% 이상 감소함을 확인하였다. 반면, wild TERT promoter를 보유한 Hep3B 세포주에서는 Huh-7.5 세포주에 비해 감소 효과가 매우 적음을 확인하였다. 상기 결과를 통해 sgRNA의 가이드 서열에 돌연변이를 도입할 경우 sgRNA의 활성화에 변화를 줄 수 있음을 확인하였다.

[162]

[163] 실시예 6: 최적의 활성을 가지는 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA의 가이드 서열 선별

[164] 앞선 실험 결과를 토대로 2-1, 2-2 sgRNA의 가이드 서열의 각 position (P1~P19)의 염기를 sgRNA가 결합하는 DNA와 동일한 염기로 치환하여 해당 부위의 RNA-DNA 염기결합이 형성되지 못하는 돌연변이를 도입한 뒤, sgRNA의 활성 변화를 *in vitro* DNA cleavage assay를 통해 확인하였다 (도 10).

[165] 도 10의 A 및 B에 나타낸 바와 같이, 2-1 sgRNA의 경우 P19, P18, P16, P9, P7, P6 돌연변이 sgRNA들이 원본 2-1 sgRNA보다 높은 활성을 나타냄을 확인하였다. 2-2 sgRNA의 경우 P19, P18, P17, P16, P10, P9, P7 돌연변이 sgRNA들이 원본 2-2 sgRNA 보다 높은 활성을 나타냄을 확인하였다.

[166] 나아가, sgRNA 가이드 서열에 돌연변이를 도입함에 따른 Cas9-sgRNA의 표적 DNA에 대한 결합 변화를 nuclease 활성이 없는 dead Cas9 (dCas9)을 이용한 gel shift assay로 확인하였다 (도 11).

[167] 도 11에 나타낸 바와 같이, 2-1 sgRNA의 경우 DNA cleavage 활성이 원본 sgRNA보다 증가한 P19, P18, P16, P9, P7, P6 돌연변이 sgRNA들이 DNA와의 결합 역시 원본 2-1 sgRNA보다 같거나 많음을 확인 하였다. P5의 경우 DNA cleavage 활성이 거의 보이지 않았지만, DNA와의 결합은 원본 2-1 sgRNA와 동등한 결과를 확인하였다 (도 11A, B). 2-2 sgRNA의 경우 DNA cleavage 활성이 원본 sgRNA 보다 증가한 P19, P18, P17, P16, P10, P9, P7 돌연변이 sgRNA 역시 DNA와 잘 결합함을 확인하였다. P15, P14, P13 돌연변이 sgRNA의 경우 DNA cleavage 활성이 전혀 관찰되지 않았지만, DNA와 매우 잘 결합함을 확인하였다. P6 돌연변이 sgRNA 역시 DNA cleavage 활성은 높지 않지만, DNA와 매우 잘 결합함을 확인하였다 (도 11C, D). 상기 결과를 통해 표적 DNA에 결합하는 sgRNA의 가이드 서열에 점 돌연변이를 도입함에 따라 Cas9-sgRNA에 의한 표적 DNA에의 결합 활성과, 표적 DNA cleavage 활성이 변할 수 있음을 확인하였다. 더불어 DNA 결합 활성과, DNA cleavage 활성이 일치하지 않는 돌연변이 sgRNA들의 사례는 sgRNA를 사용하고자 하는 Cas9의 형태에 따라 다르게 적용할 수 있음을 의미한다. 각 sgRNA의 가이드 서열은 하기 표1에 표시하였다.

[168] [표1]

위 치	2-1 sgRNA	서열 번호	2-2 sgRNA	서열 번호
P19	5'- <u>GC</u> GGCUGGGAGGGCCCGGAA -3'	4	5'- <u>GC</u> GCUGGGAGGGCCCGGAAG -3'	23
P18	5'- <u>GGC</u> GCUGGGAGGGCCCGGAA -3'	5	5'- <u>GGC</u> CUGGGAGGGCCCGGAAG -3'	24
P17	5'- <u>GGGC</u> CUGGGAGGGCCCGGAA -3'	6	5'- <u>GGGG</u> UGGGAGGGCCCGGAAG -3'	25
P16	5'- <u>GGGGG</u> UGGGAGGGCCCGGAA -3'	7	5'- <u>GGGCA</u> GGGAGGGCCCGGAAG -3'	26
P15	5'- <u>GGGGCA</u> GGGAGGGCCCGGAA -3'	8	5'- <u>GGGCU</u> GGAGGGCCCGGAAG -3'	27
P14	5'- <u>GGGGCUC</u> GGAGGGCCCGGAA -3'	9	5'- <u>GGGCUC</u> GAGGGCCCGGAAG -3'	28
P13	5'- <u>GGGGCUC</u> GAGGGCCCGGAA -3'	10	5'- <u>GGGCUGG</u> AGGGCCCGGAAG -3'	29
P12	5'- <u>GGGGCUGG</u> AGGGCCCGGAA -3'	11	5'- <u>GGGCUGGGU</u> GGGCCCGGAAG -3'	30
P11	5'- <u>GGGGCUGGGU</u> GGGCCCGGAA -3'	12	5'- <u>GGGCUGGGAC</u> GGGCCCGGAAG -3'	31
P10	5'- <u>GGGGCUGGGAC</u> GGGCCCGGAA -3'	13	5'- <u>GGGCUGGGAG</u> GCCCGGAAG -3'	32
P9	5'- <u>GGGGCUGGGAG</u> GCCCGGAA -3'	14	5'- <u>GGGCUGGGAGG</u> CCCGGAAG -3'	33
P8	5'- <u>GGGGCUGGGAGG</u> CCCGGAA -3'	15	5'- <u>GGGCUGGGAGGG</u> CCCGGAAG -3'	34
P7	5'- <u>GGGGCUGGGAGGG</u> CCCGGAA -3'	16	5'- <u>GGGCUGGGAGGGG</u> CGGAAG -3'	35
P6	5'- <u>GGGGCUGGGAGGGG</u> CGGAA -3'	17	5'- <u>GGGCUGGGAGGGGG</u> GGAAG -3'	36

P5	5'- GGGGCUGGGAGGGCC <u>G</u> GGAA -3'	18	5'- GGGCUGGGAGGGCC <u>CC</u> GAAG -3'	37
P4	5'- GGGGCUGGGAGGGCC <u>CC</u> GAA -3'	19	5'- GGGCUGGGAGGGCCCG <u>C</u> AAG -3'	38
P3	5'- GGGGCUGGGAGGGCCCG <u>C</u> AA -3'	20	5'- GGGCUGGGAGGGCCCG <u>GU</u> AG -3'	39
P2	5'- GGGGCUGGGAGGGCCCG <u>GU</u> A -3'	21	5'- GGGCUGGGAGGGCCCGGA <u>U</u> G -3'	40
P1	5'- GGGGCUGGGAGGGCCCGGA <u>U</u> -3'	22	5'- GGGCUGGGAGGGCCCGGA <u>A</u> C -3'	41

[169]

[170] 실시예 7: G12V KRAS 유전자를 표적하는 sgRNA의 가이드 서열 선별

[171] KRAS의 G12번째 아미노산을 코딩하는 염기서열이 GGT에서 GTT인 G12V로 돌연변이된 부위를 표적하는 G12V sgRNA (서열번호 3)를 제작하였다 (도 12). RAS의 발현은 조직 특이적으로 발현되는데, KRAS의 경우 대장, 흉선 그리고 폐에서 많이 발현이 되며 결장암, 췌장암, 폐암에서 KRAS의 G12V 단일 염기 돌연변이는 RAS 단백질의 구조적인 변화에 의해 GAP의 친화도와 활성도가 감소한다고 알려져 있다. Mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA와 동일하게 가이드 서열에 TERT sgRNA와 동일한 방법으로 점 돌연변이를 도입하여 wild KRAS 서열에 2개의 미스매치가 형성되도록 하였다. 이와 같이 형성된 돌연변이 sgRNA의 활성 변화를 *in vitro* DNA cleavage assay를 통해 확인하였다 (도 12). 실험에 사용한 KRAS G12V 돌연변이 DNA에 작용하는 G12V sgRNA 가이드 서열은 다음과 같다.

[172] G12V : 5' - CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT - 3' (서열번호 3)

[173] 또한, 각 돌연변이 sgRNA의 서열은 하기 표 2에 표시하였다.

[174] [표2]

위치	G12V sgRNA	서열번호
P19	5'- C <u>A</u> TGTGGTAGTTGGAGCTGT -3'	42
P18	5'- CT <u>A</u> GTGGTAGTTGGAGCTGT -3'	43
P17	5'- CTT <u>C</u> TGGTAGTTGGAGCTGT -3'	44
P16	5'- CTTG <u>A</u> GGTAGTTGGAGCTGT -3'	45
P15	5'- CTTGT <u>C</u> GTAGTTGGAGCTGT -3'	46
P14	5'- CTTGTG <u>C</u> TAGTTGGAGCTGT -3'	47
P13	5'- CTTGTGG <u>A</u> AGTTGGAGCTGT -3'	48
P12	5'- CTTGTGGT <u>T</u> GTGGAGCTGT -3'	49
P11	5'- CTTGTGGT <u>A</u> CTTGGAGCTGT -3'	50
P10	5'- CTTGTGGTAG <u>A</u> TGGAGCTGT -3'	51
P9	5'- CTTGTGGTAGT <u>A</u> GGAGCTGT -3'	52
P8	5'- CTTGTGGTAGTT <u>C</u> GAGCTGT -3'	53
P7	5'- CTTGTGGTAGTTG <u>C</u> AGCTGT -3'	54
P6	5'- CTTGTGGTAGTTGG <u>T</u> GCTGT -3'	55
P5	5'- CTTGTGGTAGTTGG <u>A</u> CCTGT -3'	56
P4	5'- CTTGTGGTAGTTGGAG <u>G</u> TGT -3'	57
P3	5'- CTTGTGGTAGTTGGAGC <u>A</u> GT -3'	58
P2	5'- CTTGTGGTAGTTGGAGCT <u>C</u> T -3'	59
P1	5'- CTTGTGGTAGTTGGAGCTG <u>A</u> -3'	60

[175]

[176] 도 13에 나타낸 바와 같이, P19, P12, P10, P9, P6 돌연변이 sgRNA들이 원본 G12V sgRNA보다 같거나 높은 활성을 나타냄을 확인하였다. G12V sgRNA의 경우 wild KRAS DNA도 절단하는 활성을 보이는데 반해, P12, P10, P6 돌연변이 sgRNA들은 wild KRAS DNA cleavage 활성이 거의 나타나지 않아, 가이드 서열의 돌연변이에 의해 DNA cleavage 활성 증가와 더불어 표적 특이성 또한 증가함을 확인하였다.

[177] 나아가, 실시예 6과 동일한 방법으로 DNA와의 결합을 gel shift assay로 확인하였다 (도 14).

[178] 도 14에 나타낸 바와 같이, P13, P6, P4, P3 돌연변이 sgRNA가 G12V sgRNA와 비슷한 정도의 결합을 보임을 확인하였다. 이 중 P6을 제외한 나머지 돌연변이

sgRNA들은 wild KRAS DNA에의 결합이 감소함을 확인하여, 돌연변이 도입에 의해 결합력을 유지하거나 증가함과 동시에 특이성 또한 원본 G12V sgRNA에 비해 증가함을 확인하였다. 이 결과들은 mutant TERT promoter를 표적하는 sgRNA의 경우와 마찬가지로 sgRNA의 가이드 서열에 점 돌연변이를 도입하면 sgRNA-Cas9의 표적 DNA 결합 활성, cleavage 활성의 변화가 있을 수 있고, 20개의 염기서열이 모두 표적과 결합하는 원본 sgRNA보다 더 좋은 활성을 가지는 sgRNA를 선별할 수 있음을 의미한다.

[179]

[180] 상기 결과를 통해, 기존에 알려진 sgRNA 가이드 서열의 seed 부위 (+2~+8 -> P2~P8 부위)의 미스매치인 경우 sgRNA-Cas9의 활성이 감소한다고 알려져 있는 것과는 다르게, TERT sgRNA 2-1의 경우 P6, P7 돌연변이 sgRNA가, 2-2의 경우 P7 돌연변이 sgRNA가 원본 sgRNA보다 높은 활성을 나타냄을 확인하였다. G12V kras sgRNA의 경우 P3, P4, P6 돌연변이 sgRNA에서 원본 sgRNA 보다 높은 활성 혹은 표적 특이성을 나타내었다.

[181]

[182] 따라서, sgRNA의 가이드 서열 20개 염기 중 활성에 매우 중요하다고 알려진 seed 부위의 미스매치 도입으로 오히려 sgRNA의 활성 혹은 특이성의 변화를 보여주는 결과를 통해, 점 돌연변이 도입에 의한 sgRNA 가이드 서열 스크리닝에 seed 부위에의 돌연변이 도입을 제외하지 않아야 함을 확인하였다.

[183]

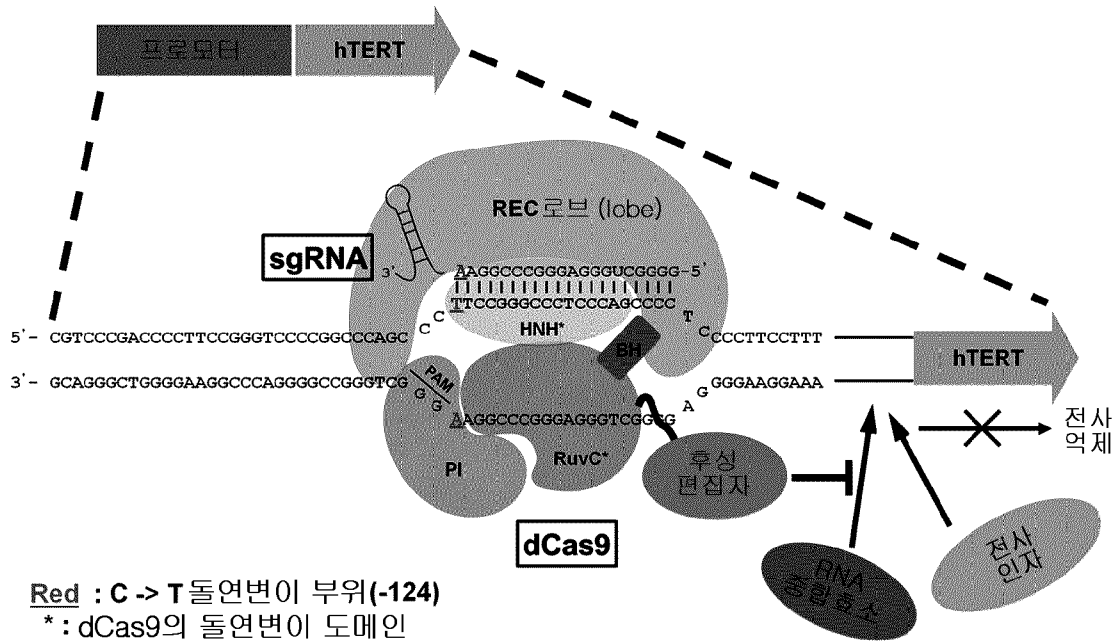
[184] 종합적으로, 본 발명에 따른 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA) 및 이를 이용한 CRISPR 시스템은 기존 sgRNA에 비하여 표적 DNA에 유의적으로 특이성 및 억제 효과를 향상시키는 바, 이러한 sgRNA와 이를 이용한 CRISPR 시스템은 유전자 가위를 이용한 유전자 교정용 조성물, 유전체 수준의 스크리닝, 암을 비롯한 다양한 질병의 치료제, 질병 진단 또는 이미징용 조성물 개발, 형질전환동물 개발 등의 폭넓은 분야에 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

청구범위

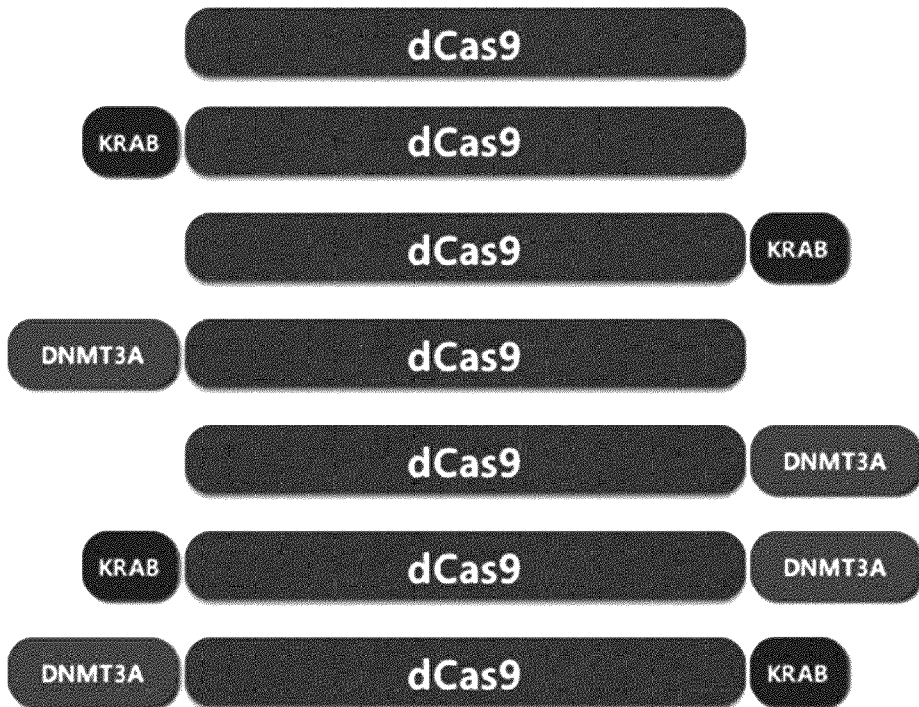
- [청구항 1] CRISPR 시스템의 기능을 향상시키는 방법으로서,
표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA에서, 표적 DNA와 이에 상보적인 뉴클레오타이드 서열 간에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스-인접 모티프(protopspacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것인, 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 방법은 미스매치가 없는 가이드 RNA에 비하여 특이성 또는 민감성이 증가하는 것인, 방법.
- [청구항 4] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, DNA 표적용 조성물에 있어서,
상기 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 것인, 조성물.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스-인접 모티프(protopspacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것인, 조성물.
- [청구항 6] 청구항 4에 있어서, 상기 Cas9은 생물학적으로 불활성화된 Cas (dCas)인 것인, 조성물.
- [청구항 7] 청구항 4에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 C-말단, N-말단 또는 C-말단 및 N-말단에, KRAB (Kruppel associated box), KOX (Kruppel-type zinc finger factor), SID (mSin interaction domain), MBD2(methyl-CpG binding domain protein 2), MBD3, DNMT1 (DNA Methyltransferase 1), DNMT3A (DNA methyltransferase 3A) 및 DNMT3B (DNA methyltransferase 3B)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 도메인이 연결된 것인, 조성물.
- [청구항 8] 청구항 7에 있어서, 상기 Cas9 단백질은 N-말단에 KRAB 도메인이 연결된 것인, 조성물.
- [청구항 9] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열이 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA).
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 미스매치는 표적 DNA의 프로토스페이스-인접 모티프(protopspacer-adjacent motif, PAM)로부터 +1 내지 +19에 위치하는 것인, 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA).

- [청구항 11] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열에 1개 이상의 미스매치 (mismatch)를 부여하는 단계를 포함하는, 단일 가닥 가이드 RNA (sgRNA)의 제조 방법.
- [청구항 12] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 유전자 교정용 조성물.
- [청구항 13] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 14] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 진단용 조성물.
- [청구항 15] 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 가이드 RNA로서, 표적 DNA에 상보적인 뉴클레오타이드 서열은 표적 DNA와 1개 이상의 미스매치(mismatch)를 포함하는 가이드 RNA; 및 Cas9 폴리펩타이드 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 암의 이미징 조성물.
- [청구항 16] 청구항 4의 DNA 표적용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, DNA 표적 방법.
- [청구항 17] 청구항 12의 유전자 교정용 조성물을 분리된 진핵 세포 또는 진핵 유기체에 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 교정 방법.
- [청구항 18] 청구항 13의 암의 예방 또는 치료용 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 암의 예방 또는 치료 방법.

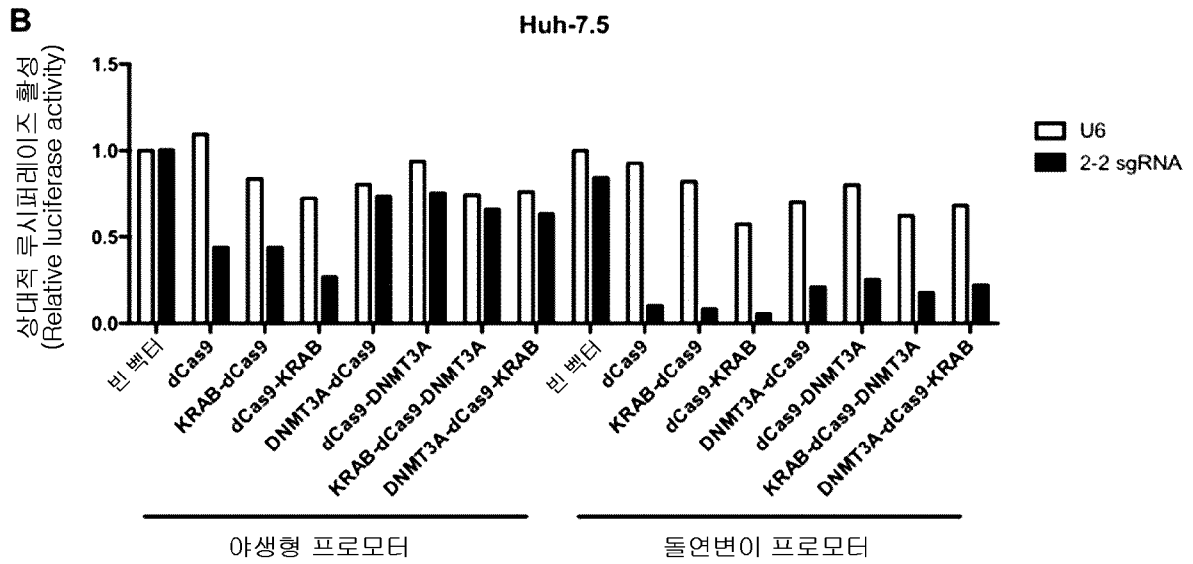
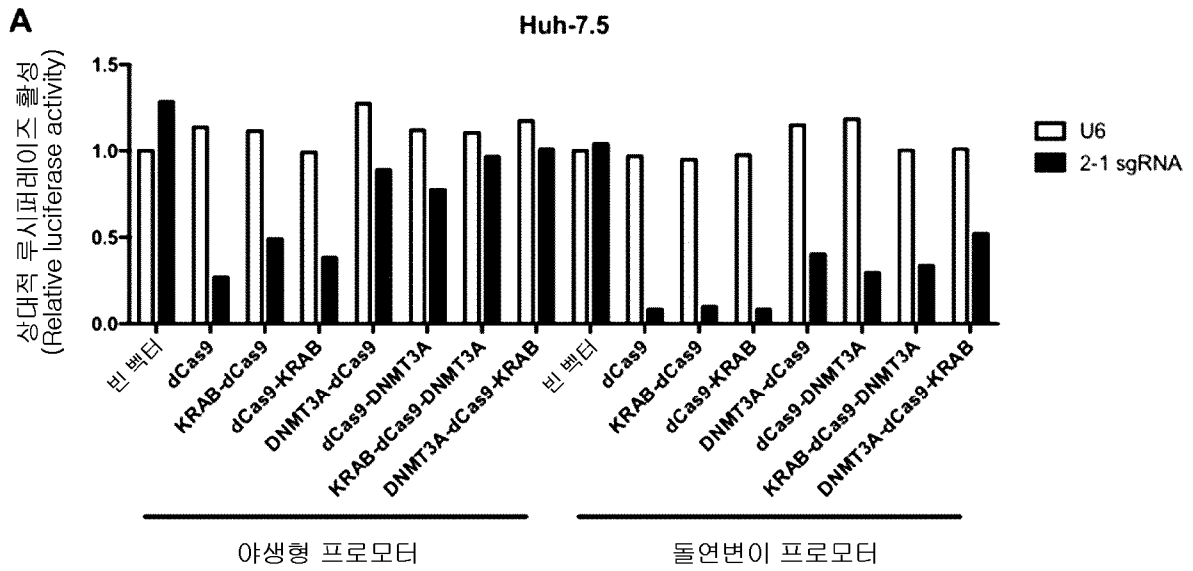
[도3]



[도4]



[도5]



[도6]

A

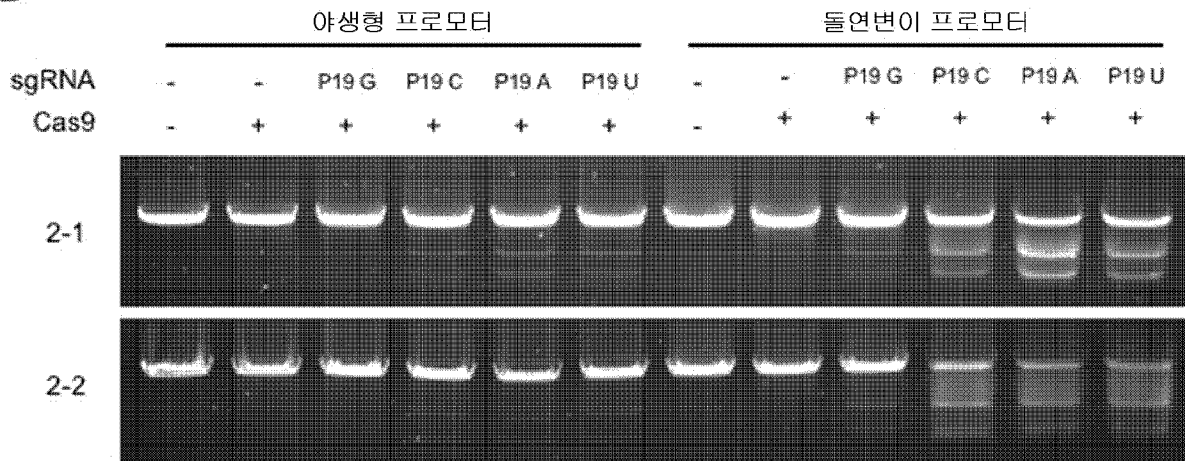
5' – GGGGCUGGGAGGGCCCGGAA PAM – 3' 2-1 sgRNA

5' – GGGCUGGGAGGGCCCGGAAG PAM – 3' 2-2 sgRNA

↑
P19

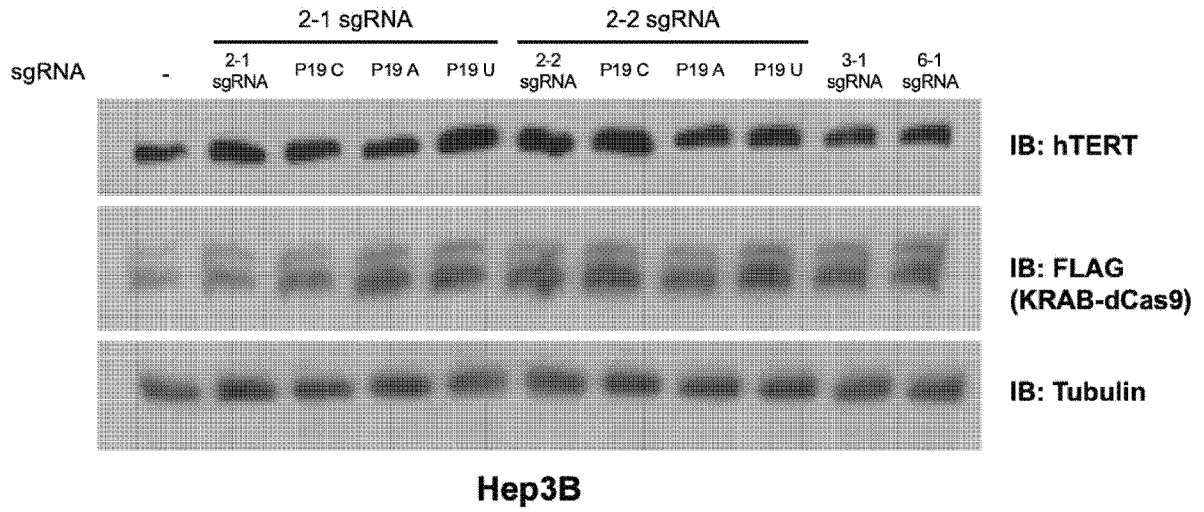
↑
P1

B

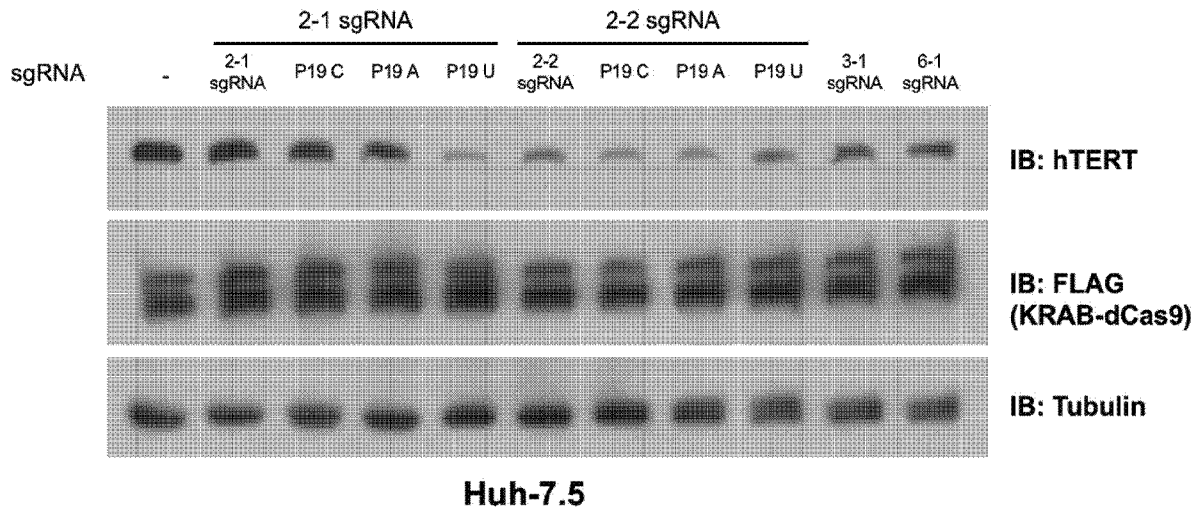


[도7]

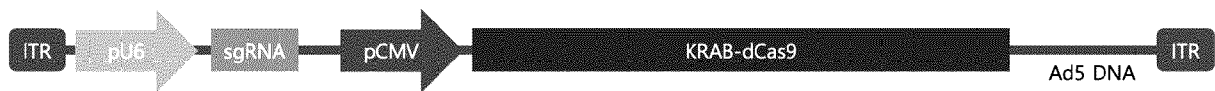
A



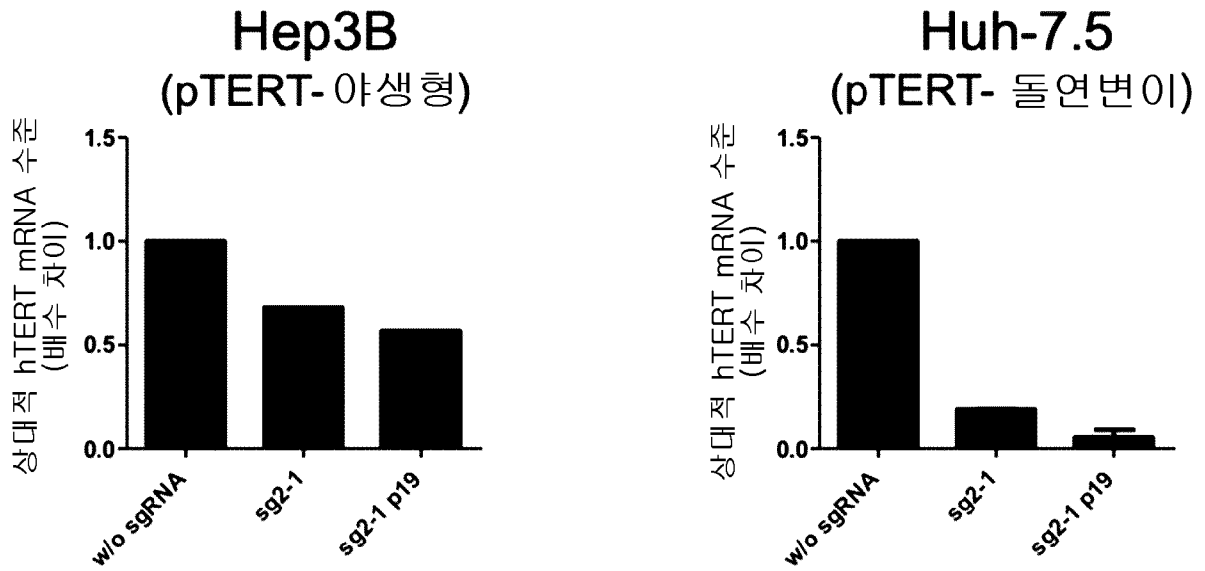
B



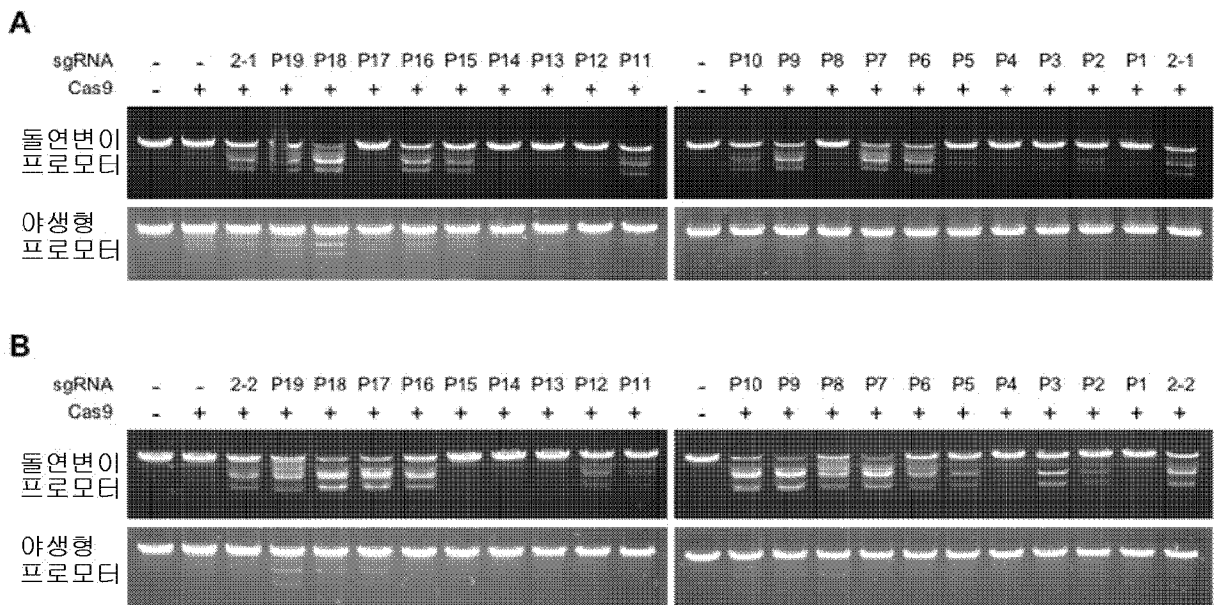
[도8]



[도9]

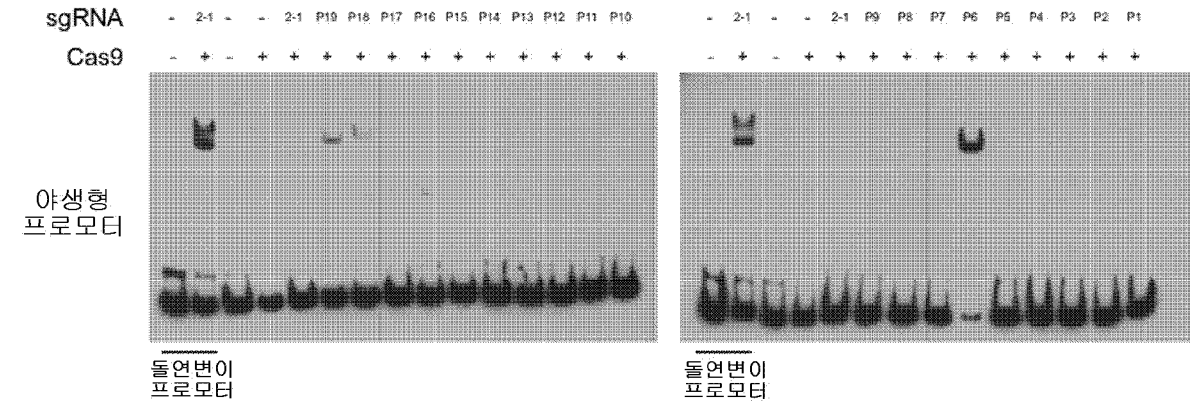


[도10]

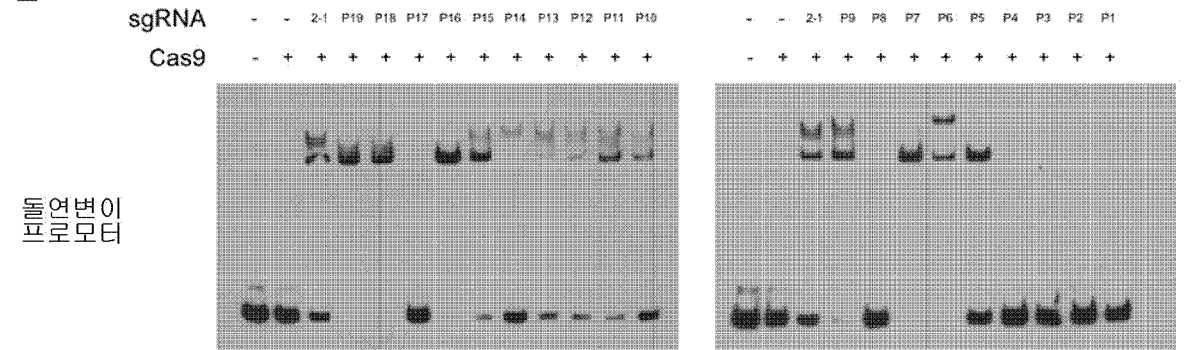


[도11]

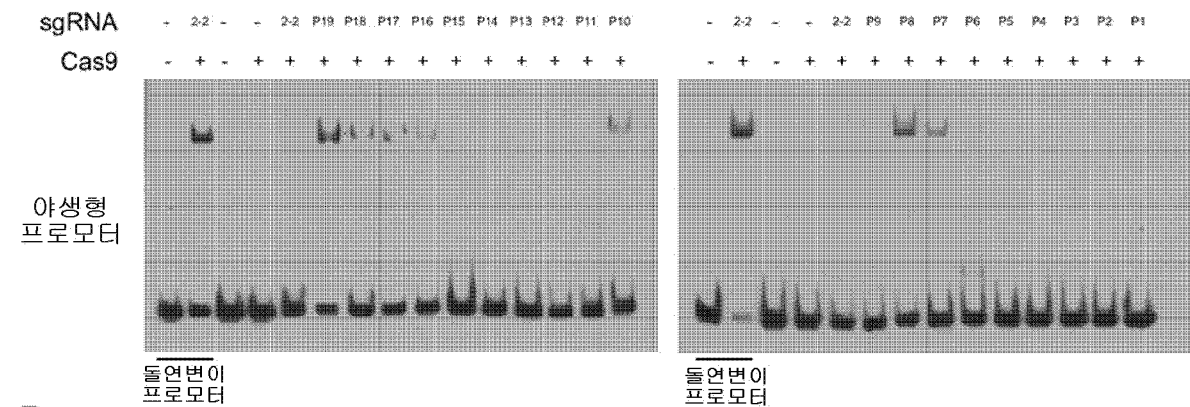
A



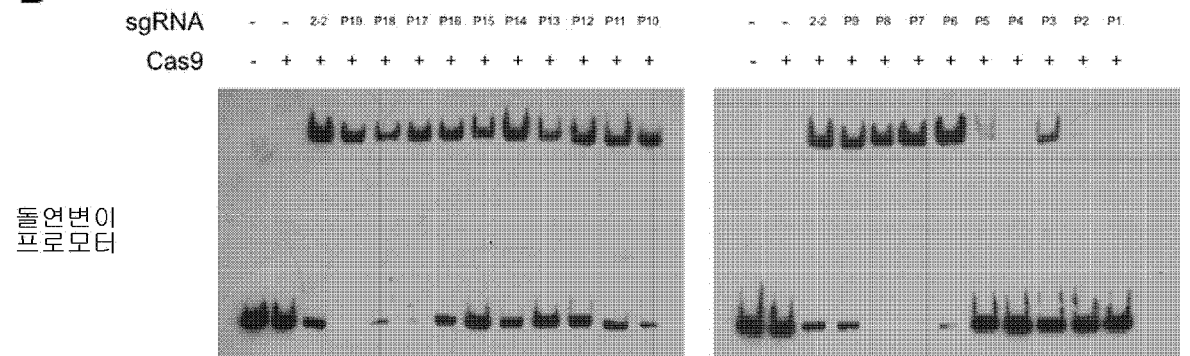
B



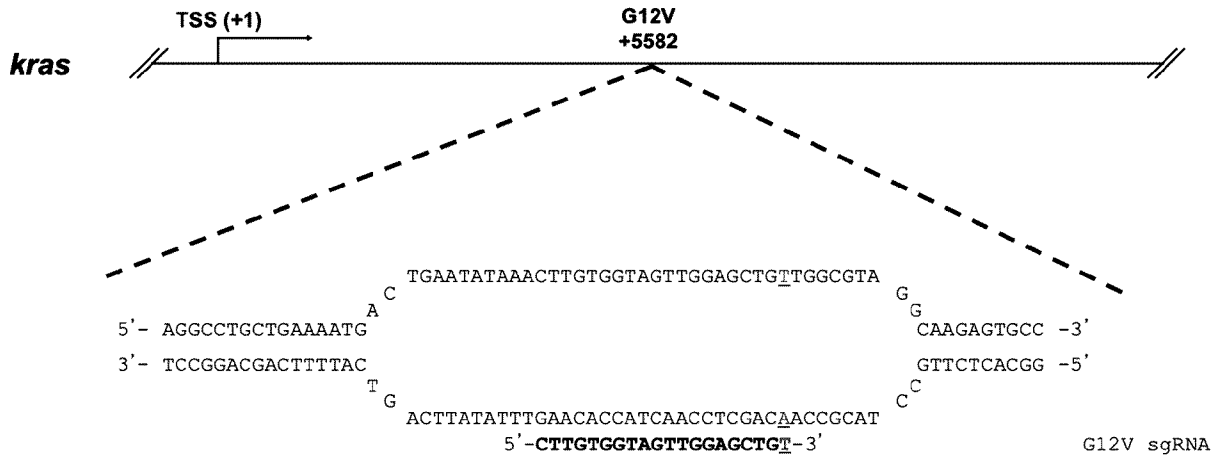
C



D

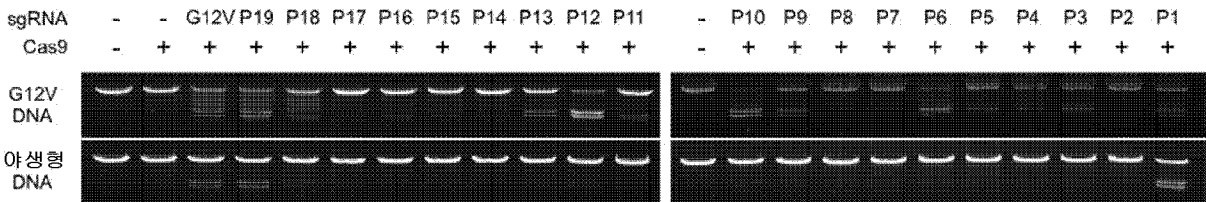


[도12]



Red : G12V돌연변이 부위(GGT -> GTT)
TSS : 전사 개시점 (Transcription start site)

[도13]



[도14]

